

- на грызущих вредителей хлопчатника.— В кн.: Физиология и токсикология насекомых — вредителей хлопчатника.— Ташкент : Фан, 1970.— 69 с.
- Ижевский С. С. Некоторые свойства карбогидраз кишечника колорадского жука.— Биол. науки, 1973, № 9, с. 37.
- Лаппа Н. В., Нагорная И. М., Анохина В. П. Влияние боверина и его смеси с пониженными нормами инсектицида на карбогидразы кишечника капустной совки.— В кн.: Патология членистоногих и биологические средства борьбы с вредными организмами. Киев : Изд-во Киев. ун-та, 1974, с. 108—110.
- Нагорна І. М., Лаппа Н. В., Гораль В. М., Анохіна В. П. Активність тканевих протеаз яблуневої плодожерки при мікозі.— В кн. Третій Український біохімічний з'їзд, серпень 1977. Донецьк, 1977, с. 234.
- Филиппович Ю. Б., Минина Н. И. Амилаза в тканях тутового шелкопряда *Bombyx mori*.— В кн.: Вопросы экологической физиологии беспозвоночных. М. : Наука, 1974, с. 213—218.
- Цибульська А. И. Патологические изменения в организме колорадского жука, вызванные грибом *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill.— В кн.: Патогенные микроорганизмы вредителей растений. Рига : Зинатне, 1972, с. 36—37.
- Eguchi M., Iwamoto A. Alkaline proteases in the midgut tissue and digestive fluid of the silkworm *Bombyx mori*.— *Insect Biochem.*, 1976, 6, p. 491—496.
- Pant R., Morris J. Proteolytic and amilolytic activity in *Philosamia ricini* (Erl silkworm) during development.— *Indian J. Biochem.*, 1969, 6, N 3, p. 156.
- Rensuke K. Нихон сансигакү дзасси.— *J. Sericult Sci Jap.* 1980, 49, N 2, p. 124—132.
- Terra W. R., Ferreir C., de Bianchi A. G. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rynchosciara* and its physiological significance.— *J. Insect Physiol.*, 1979, 25, N 6, p. 487—494.

Украинский п.-н. институт
защиты растений

Поступила в редакцию
2.IV 1981 г.

УДК 595.787:577.152

Т. Ф. Галанова, Н. М. Деревянко, Р. И. Шведова

ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОЛАЗ В ПРОЦЕССЕ МЕТАМОРФОЗА НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА

При изучении экологических особенностей нижнеднепровской популяции непарного шелкопряда выявлено существование внутрипопуляционного полиморфизма по типу окраски гусениц (Колыбин, Зелинская, 1969). В результате исследований установлено также, что тип окраски гусениц является наследуемым признаком (Деревянко, 1980). Причем соотношение «черных» и «серых» гусениц при различной численности популяции закономерно изменяется в зависимости от фазы градации численности. Вероятно, в популяции происходит автоматический отбор особей гетерозиготных или двух форм (гетеро- и гомозиготных) по окраске, отличающихся различными направлениями векторов отбора в разные сезоны года. Следовательно, более глубокое исследование фенотипов непарного шелкопряда по окраске даст возможность изучить те процессы, которые определяют внутрипопуляционную изменчивость и проявляются в структуре популяции, функция которой выражается в динамике ее численности. Поэтому исследование комплекса гидролитических ферментов пищеварения у гусениц непарного шелкопряда явится одним из подходов более глубокого изучения дискретности фенотипов в популяции, поскольку биохимический полиморфизм гидролаз у разных фенотипов насекомого проявляется уже на стадии яйца.

Материал и методы. Объектом исследования служили гусеницы непарного шелкопряда нижнеднепровской популяции I и V возрастов (серый и черный фенотипы по признаку окраски), приуроченные к питанию листьями дуба. В качестве препарата ферментов использовали супернатант, полученный путем центрифугирования на холоде при 6 тыс. об/мин гомогената из 10 гусениц I возраста, а также средней кишки одной гусеницы V возраста в 0,2 мл 0,005 М трис-глицинового буфера pH 8,3.

Ферменты фракционировали в 7,5%-ном полиакриламидном геле методом диск-электрофореза в модификации Филипповича и Щеголевой (1967). На каждую колонку наносили по 250—300 γ белка. Электрофорез проводили при 4 °C в течение 2,5—3 часов. Ферменты выявляли непосредственно на гелевых колонках сразу после окончания электрофореза, используя инкубационные смеси следующих составов. Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1): 6,0 мг нафтол-AS-BS-фосфата; 0,2 мл диметилсульфокси-

да; 16,0 мл 0,2 М трис-НСl буфера рН 7,4; время инкубации 20 мин при 37° С. Кислая фосфатаза (КФ 3.1.3.2): 4,0 мг α -нафтилфосфата; 16,0 мл 0,2 М ацетатного буфера рН 4,8; время инкубации 20 мин при 37° С. Эстераза: 10 мг α -нафтилацетата, несколько капель 50%-ного ацетона; 16,0 мл 0,2 М трис-НСl буфера рН 7,4; время инкубации 15 мин при комнатной температуре. В качестве красителя для этих ферментов использовали 0,2%-ный водный раствор прочного синего В. Амилаза: 16,0 мл 0,2 М ацетатного буфера рН 5,6; время инкубации 60 мин при 37° С; краситель 0,3% J_2 в 3% KJ.

Сканирование ферментов проводили на денситометре, сделанном в отделе на базе ФЕК-56 М. Активность ферментов выражали в условных единицах, рассчитанных по формуле Симпсона. Расположение фракций на фореграммах идентифицировали по величине относительной электрофоретической подвижности (ОЭП).

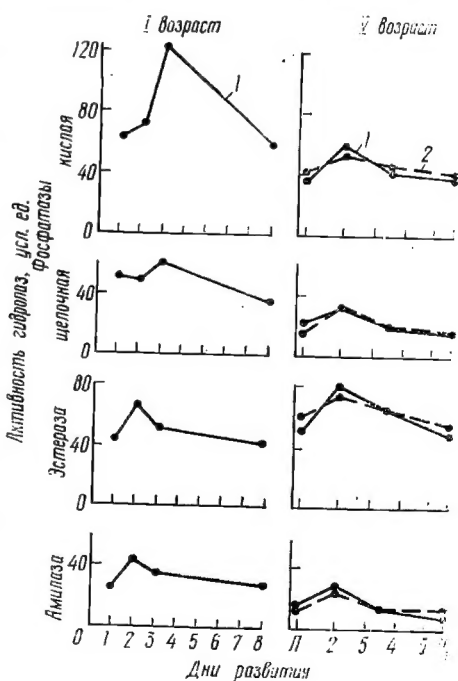
Все опыты проведены в 3—4 биологических повторностях и 2 аналитических вариантах. Числовые значения активностей и ОЭП обработаны статистически (Ойвин, 1960).

Результаты и обсуждение. Исследована активность и выявлена динамика комплекса гидролитических ферментов у питающихся листьями дуба гусениц I и V возрастов по дням развития. Данные рис. 1 показывают, что у гусениц I возраста максимальная активность эстеразы и амилазы выявлена на 2-й, а кислой и щелочной фосфатаз — на 3-й день развития насекомого в этом возрасте. На 8-й день, когда гусеница линяет на следующий возраст, активность всех исследованных ферментов снижалась. У гусениц V возраста активность этих гидролаз была наивысшей на 2-й день развития и снижалась к моменту линьки на следующий возраст.

На фореграммах кислая и щелочная фосфатазы у гусениц I возраста (рис. 2, А) представлены в виде 1—2 форм, расположенных в зоне средних значений ОЭП. У гусениц V возраста (рис. 2, Б, В) кроме уже названных форм на 5-й день развития обнаруживается и 3-я множественная форма ферментов в той же области подвижности. Эстераза расположена на фореграммах в зоне средней и малой ОЭП. У гусениц I возраста она представлена 3—4 множественными формами, у особей V возраста серого типа окраски обнаружены 4—6, у черного фенотипа 5—7 множественных форм. Наибольшая множественность форм эстеразы отмечена у гусениц обоих возрастов на 2-й день развития в каждом возрасте. Расположение амилазы на фореграммах у гусениц I и V возрастов варьирует. В частности, у гусениц I возраста в 1-й день фермент представлен в виде одной быстро движущейся полосы, а начиная со 2 дня и вплоть до момента линьки — двумя формами, одна из которых расположена в зоне малой ОЭП, тогда как другая в зависимости от сроков развития гусениц меняет свое положение, проявляясь вначале в зоне средней, а затем только в зоне большой ОЭП. Амилаза у гусениц V возраста обнаруживается только в зоне малой ОЭП.

Рис. 1. Динамика активности гидролитических ферментов у гусениц непарного шелкопряда I и V возрастов:

1 — гусеницы серого фенотипа; 2 — гусеницы черного фенотипа; Л—Л₁ — линька.



На протяжении метаморфоза насекомого только личиночная стадия является питающейся. Именно в этот период наблюдается рост и накопление в организме запасных питательных веществ, которые, с одной стороны, должны способствовать нормальному переходу особи в следующий возраст, а с другой — должны будут поддерживать жизнеспособность куколки, бабочки и яйца, т. е. стадий развития насе-

комого, осуществляемых без потребления пищи. Это, естественно, не может не сказаться на активности ферментов, принимающих участие в пищеварении насекомого.

Снижение активности гидролаз в периоды линек, наблюдаемое, согласно нашим данным, у гусениц непарного шелкопряда, и у тутового шелкопряда (Минина, Филиппович, 1974), коррелирует с понижением в теле гусениц в этот момент содержания гликогена и растворимых углеводов (Carstens, Stoch, 1980), а также липидов (Pant Kumar, 1979).

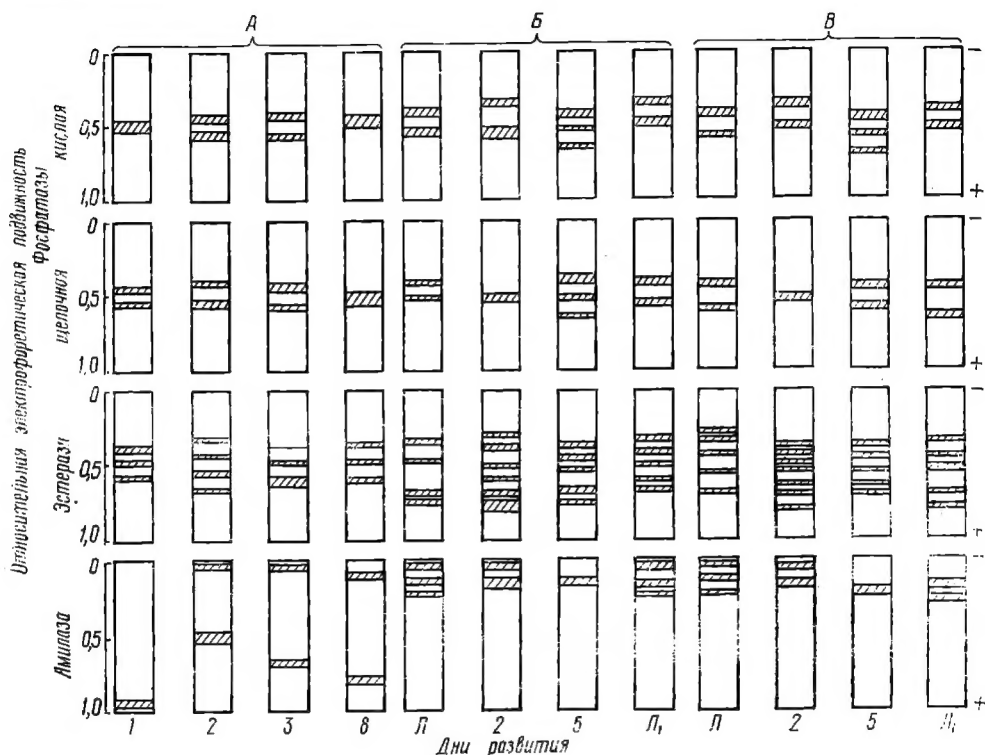


Рис. 2. Схема расположения ферментов у гусениц непарного шелкопряда:

А — I возраст серого фенотипа дубовой микропопуляции; Б — V возраст серого фенотипа; В — V возраст черного фенотипа; Л — линька с IV на V возраст; Л₁ — линька с V на VI возраст.

В периоды роста гусениц, наоборот, активность ферментов пищеварения повышается, особенно в начале роста, что объясняется потреблением большого количества пищи с необходимыми для жизнедеятельности веществами. Эти вещества, в частности, подвергаются прямому окислению (Смолин, 1953) и используются гусеницами младших возрастов для локомоторной деятельности (Pant, Kumar, 1979), а также превращаются в липиды, особенно в первые дни каждого возраста (Woodring, e. a., 1977), откладывающиеся у гусениц старших возрастов в качестве запасных питательных веществ. Этим, вероятно, можно объяснить повышение активности амилазы и фосфатаз, принимающих участие в утилизации углеводов, у гусениц непарного шелкопряда в первые дни каждого исследованного возраста. Кроме того, варьирование активности фосфатаз коррелирует с обменом фосфора, что было доказано с помощью использования меченого фосфора (Демяновский, Русакова, 1957).

Для личиночной стадии развития насекомого характерна определенная цикличность в проявлении активности гидролитических ферментов. У гусениц непарного шелкопряда от I (начального) до V и VI (в зависимости от пола особи) возрастов, завершающих стадию гусеницы, наблюдается снижение активности кислой и щелочной фосфатаз, что показано и для гусениц тутового шелкопряда (Минина, Филиппович, 1974). Активность эстеразы, как и количество форм фермента, наоборот, с возрастом гусениц непарного шелкопряда повышалась, что также установлено для тутового (Минина, Филиппович, 1974). По мере завершения личиночной стадии развития у многих насекомых повышается амилазная активность (Кутузова, 1977), однако

у гусениц непарного шелкопряда мы наблюдали некоторое снижение активности этого фермента.

Варьирование активности ферментов пищеварения на протяжении личиночной стадии развития насекомого находится в тесной связи с химическим составом листа. Во время вегетации химический состав листьев варьирует: в молодых листьях дуба содержится значительное количество белка и азотистых веществ, тогда как в летнем листе содержание белка и азотистых веществ уменьшается при одновременном повышении содержания крахмала, клетчатки, растворимых сахаров и жиров (Эдельман, 1953). Повышение содержания липидов в теле гусениц непарного шелкопряда с 5,8% в I возрасте до 20,6% у гусениц V возраста (Эдельман, 1953) коррелирует с полученными нами данными о повышении у гусениц вредителя старших возрастов активности эстеразы, принимающей участие в расщеплении липидов. Более того, повышение активности этого фермента у гусениц непарного шелкопряда старших возрастов связано с активацией находившихся ранее в форме зимогенов новых форм эстеразы (Eguchi, 1965).

Величина активности гидролаз у гусениц серого и черного фенотипов старших возрастов идентична, однако количество форм ферментов, выявляемых на фореграмме, варьирует. Множественность форм эстераз (рис. 2, Б и 2, В), присущая гусеницам непарного шелкопряда черного типа окраски, по сравнению с таковой, выявленной у особей, относящихся к серому фенотипу, свидетельствует о структурной неоднородности популяции насекомого, которая, по нашим данным, проявляется уже на стадии яйца и сохраняется не только в периоды личиночного развития, но, вероятно, и в течение всей жизни особей непарного шелкопряда.

- Деревянко Н. М. Полиморфизм белков непарного шелкопряда в связи с феноструктурой популяции.— В кн.: Роль дендрофильных насекомых в таежных экосистемах. Тез. докл. Всесоюз. конф. 15—17 апр. 1980 г., Дивногорск. Красноярск, 1980, с. 42—43.
- Демьяновский С. Я., Русакова Н. С. Фосфорный обмен в организме дубового шелкопряда *Antherea pernyi* G.— Учен. зап./Моск. пед. ин-т им. В. И. Ленина, 1957, 98, вып. 2, с. 59—64.
- Колыбин В. А., Зелинская Л. М. Эколого-фаунистические особенности популяции непарного шелкопряда в Нижнем Приднепровье. Сообщ. 1. Структура популяции.— Вестн. зоологии, 1969, № 3, с. 37—42.
- Кутузова Н. М. Пищеварительные ферменты тутового шелкопряда в онтогенетическом и породно-гибридном аспектах. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1977.— 14 с.
- Минина Н. И., Филиппович Ю. Б. Множественные формы ферментов и регуляция их активности в тканях тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. в процессе онтогенеза.— В кн.: Биохимия насекомых. М.: МГПИ им. В. И. Ленина, 1974, вып. 16, с. 9—90.
- Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований.— Патол. физиология и эксперим. терапия, 1960, 4, с. 76—85.
- Смолин А. Н. Материалы по изучению углеводного обмена у шелкопряда.— Учен. зап./Моск. пед. ин-т им. В. И. Ленина, 1953, 77, вып. 7, с. 13—24.
- Филиппович Ю. Б., Щеголева Л. И. Исследования растворимых белков тканей тутового шелкопряда методом электрофореза в полиакриламидном геле.— Докл. АН СССР, 1967, 174, вып. 1, с. 240—242.
- Эдельман Н. М. Влияние кормового режима на развитие непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) и тополевого листоеда (*Melasoma populi* L.).— Энтомол. обзор., 1953, 33, № 1, с. 36—46.
- Carstens S., Storch V. Beeinflussung der Ultrastruktur von Fettkörper und Mitteldarm des Staphyliniden *Atheta fundi* (Grav.) durch Umwelteinflüsse.— Zool. Jahrb. Anat. Anat. und Ontol. Tiere., 1980, 103, N 1, S. 73—84.
- Eguchi M., Sugimoto T. Changes in esterase in silkworm, *Bombyx mori* L. during development.— Insect Physiol., 1965, 11, N 8, p. 1145—1148.
- Pant R., Kumar S. Metabolic fate of carbohydrates and lipids during moulting cycle of carbohydrates (Lepidoptera: Saturniidae).— Insect Biochem., 1979, 9, N 6, p. 577—582.
- Woodring J., Roe R., Clifford C. Relation of feeding, growth and metabolism to age in the larval, female house cricket.— J. Insect Physiol., 1977, 23, N 2, p. 207—212.